

Biomédica 2006;26:498-508

RESEÑA HISTÓRICA

La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal

Orlando Torres-Fernández

Laboratorio de Microscopía, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia.

La técnica de Golgi es un sencillo procedimiento histológico que revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata (reacción negra). Camillo Golgi, su descubridor, y Santiago Ramón y Cajal, su principal exponente, recibieron el premio nobel de Medicina y Fisiología en 1906 por su contribución al conocimiento de la estructura del sistema nervioso. Gran parte de sus logros se obtuvieron a través de la aplicación del método de impregnación argéntica. Sin embargo, Golgi y Cajal tenían interpretaciones diferentes sobre la estructura del tejido nervioso. Golgi era defensor de la teoría reticular, la cual proponía que el sistema nervioso estaba conformado por una red de células fusionadas a través de los axones a manera de un sincitio. Por el contrario, la doctrina neuronal, defendida por Cajal, sostenía que las neuronas eran células independientes. También se debe a Golgi y su *reazione nera* el descubrimiento del organelo celular conocido como 'aparato de Golgi'. La microscopía electrónica confirmó los postulados de la doctrina neuronal, así como la existencia del complejo de Golgi, y contribuyó al resurgimiento de la técnica de impregnación argéntica. Aunque existen métodos modernos de tinción intracelular que revelan imágenes excelentes de la morfología neuronal, la técnica de Golgi se mantiene vigente por ser un método más práctico y menos costoso para el estudio de la morfología normal y patológica de las neuronas.

Palabras clave: neuroanatomía, neuronas, técnicas histológicas, aparato de Golgi, historia de la medicina, premio nobel.

The Golgi silver impregnation method: commemorating the centennial of the Nobel Prize in Medicine (1906) shared by Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal

The Golgi silver impregnation technique is a simple histological procedure that reveals complete three-dimensional neuron morphology. This method is based in the formation of opaque intracellular deposits of silver chromate obtained by the reaction between potassium dichromate and silver nitrate (black reaction). Camillo Golgi, its discoverer, and Santiago Ramón y Cajal its main exponent, shared the Nobel Prize of Medicine and Physiology in 1906 for their contribution to the knowledge of the nervous system structure. Their successes were largely due to the application of the silver impregnation method. However, Golgi and Cajal had different views on the structure of nervous tissue. According to the Reticular Theory, defended by Golgi, the nervous system was formed by a network of cells connected via axons within a syncytium. In contrast, Cajal defended the Neuron Doctrine which maintained that the neurons were independent cells. In addition, Golgi had used a variant of his "black reaction" to discover the cellular organelle that became known as the Golgi apparatus. Electron microscopy studies confirmed the postulates of the Neuron Doctrine as well as the existence of the Golgi complex and contributed to a resurgence of use of the Golgi stain. Although modern methods of intracellular staining reveal excellent images of neuron morphology, the Golgi technique is an easier and less expensive method for the study of normal and pathological morphology of neurons.

Key words: neuroanatomy, neurons, histological techniques, Golgi apparatus, history of medicine, Nobel Prize.

Este artículo tiene como propósito hacer un reconocimiento al método histológico que revolucionó la neurociencia a finales del siglo XIX y que en pleno siglo XXI continúa vigente a pesar de los avances tecnológicos modernos. Existen numerosas publicaciones sobre los genios de la ciencia que lo hicieron famoso (1-9); por eso esta reseña, aunque obviamente debe referirse a ellos, se ha enfocado más en acontecimientos relacionados con el origen y desarrollo de la técnica misma. El método de impregnación argéntica neuronal, o técnica de Golgi, se dio a conocer en 1873 y surgió, aparentemente, como resultado de un hallazgo fortuito del médico y neurobiólogo italiano Camillo Golgi (1843-1926). Posteriormente, los trabajos de otro médico neurobiólogo, el español Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), revelaron la verdadera dimensión de ese descubrimiento (1-4). Los dos investigadores recibieron el premio nobel de Fisiología y Medicina en 1906, “en reconocimiento por su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso” (5), realizado, en gran parte, con la aplicación de esta técnica (1-5). Golgi y Cajal (figura 1) habían sido nominados al Nóbel en los años anteriores (6), pero Cajal, con algo de escepticismo, consideraba que la anatomía y la histología no serían ciencias a tener en cuenta en la definición de fisiología o medicina según los estatutos del premio nobel (7). Hoy se reconoce el aporte significativo de los estudios de Cajal y Golgi al conocimiento general del sistema nervioso, y no solamente de la neuroanatomía (8,9). Con su técnica, Golgi logró por primera vez la visualización de neuronas marcadas que mostraban su estructura completa (cuerpo celular, dendritas y axón) en una preparación histológica. Después de su descubrimiento, Golgi continuó con los estudios del tejido nervioso utilizando su método (3,4), pero fue en manos de Cajal, casi dos décadas después, que la técnica de Golgi se convirtió en la herramienta que cambió el curso de la historia

de la neurociencia. Cajal se sorprendió por tantos años de indiferencia de la comunidad científica ante tan importante descubrimiento (9).

Origen y desarrollo inicial de la técnica de Golgi

La técnica de impregnación argéntica o *reazione nera* (reacción negra), como la llamó Golgi (3,4), se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producidos por la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata. La impregnación revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. La imagen que se observa de una neurona coloreada con el método de Golgi equivale, en menor escala, a la que se obtiene de una neurona reconstruida a partir de cortes seriados en microscopía electrónica de transmisión (10). También es similar a la que podría obtenerse con un microscopio electrónico de barrido. Por el contrario, las técnicas histológicas convencionales apenas permiten la observación del perfil del cuerpo neuronal y algunos fragmentos de dendritas en un solo plano (figura 2). El estudio ultraestructural ha demostrado que la impregnación ocurre dentro de la célula, a través del citoplasma, con excepción de algunos organelos (10).

En la época en que Golgi descubrió su método, el bicromato de potasio era utilizado como un fijador y endurecedor de cerebros completos. También eran ya conocidas las tinciones con nitrato de plata. Gustav Retzius (1842-1919), un reconocido neuroanatomista sueco, había desarrollado una tinción de plata para observar la piamadre (la membrana más interna de las meninges encefálicas y que Retzius llamaba ‘pía íntima’). Retzius escribió en un pie de página de su autobiografía el relato que le hizo un asistente de Golgi sobre el hallazgo de la *reazione nera*. Según este, Golgi ensayó la tinción de plata de Retzius en muestras de cerebros previamente colocadas en bicromato de potasio, con el propósito de estudiar la membrana encefálica, pero al observar el tejido cerebral adyacente descubrió las imágenes de las estructuras que él consideró eran las células del sistema nervioso (11,12). Esa interpretación ha sido considerada una genialidad,

Correspondencia:

Orlando Torres-Fernández, Laboratorio de Microscopía,
Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 No. 51-60,
Bogotá D.C., Colombia.
otorresf@ins.gov.co

Recibido: 17/08/06; aceptado: 17/10/06



Figura 1. Fotografías de Camillo Golgi (izquierda) y Santiago Ramón y Cajal (derecha). © The Nobel Foundation. Reproducidas con autorización de la Fundación Nobel. Cortesía de Jonna Petterson, Gerente de Relaciones Públicas, Fundación Nobel.

pues los conocimientos que se tenían sobre la estructura neuronal eran escasos (13).

En los años siguientes al descubrimiento de su método original de impregnación, Golgi introdujo modificaciones importantes. Una de ellas fue la adición de tetróxido de osmio al bicromato de potasio (14), técnica aún conocida como el 'método de Golgi rápido' (10,13,15). Otra fue la utilización de cloruro de mercurio en lugar del nitrato de plata para obtener la impregnación con mercurio metálico. A esta segunda variante, en 1891 Cox agregó el uso de cromato de potasio después del tratamiento inicial con bicromato de potasio y cloruro de mercurio. Este procedimiento es conocido como el 'método de Golgi-Cox' (11,13). Con su método, Golgi llevó a cabo diversos estudios sobre la estructura histológica del sistema nervioso, la mayoría de los cuales publicó en revistas científicas italianas de poca circulación en otros países europeos (3,4). No obstante, por la información hallada en diferentes referencias, es evidente que antes de Cajal la técnica era conocida por varios de los científicos destacados de la época, tales como Kölliker (1,2), Retzius (12), Ranvier y Simarro (16), este último, un destacado siquiatra y neurólogo español (17). En una visita a Simarro en 1887, Cajal conoció la técnica de Golgi (2,9,16,17), se entusiasmó con ella y le introdujo modificaciones que mejoraron

enormemente la calidad de las imágenes de las preparaciones neurohistológicas. La principal de ellas fue el "proceder de doble impregnación", es decir, la repetición de cada una de las etapas de inmersión del tejido en las soluciones utilizadas. También influyó que hubiera trabajado con cortes más gruesos para facilitar la observación tridimensional de todos los componentes neuronales. Otro motivo de su éxito fue el haber utilizado material embrionario y de animales jóvenes, en lugar de comenzar directamente con los adultos (generalmente de cerebros humanos), como se acostumbraba en ese tiempo. La menor cantidad de mielina existente en el cerebro de animales jóvenes facilita la impregnación (1,2,9).

Cajal, Kölliker y la doctrina neuronal

El prestigioso anatomista suizo Albert von Kölliker (1817-1905) jugó un papel determinante en la divulgación y aceptación de los trabajos de Cajal (1,2,9). Kölliker había publicado las primeras descripciones neurohistológicas de la corteza cerebral con técnicas rudimentarias, y dio el nombre de "piramidales" a las células corticales principales (18). Estas neuronas están entre las que mejor responden a la técnica de Golgi (figura 2). El interés de Kölliker por la neurohistología lo llevó a visitar el laboratorio de Golgi en 1887 para conocer su técnica, pero luego no tuvo éxito al

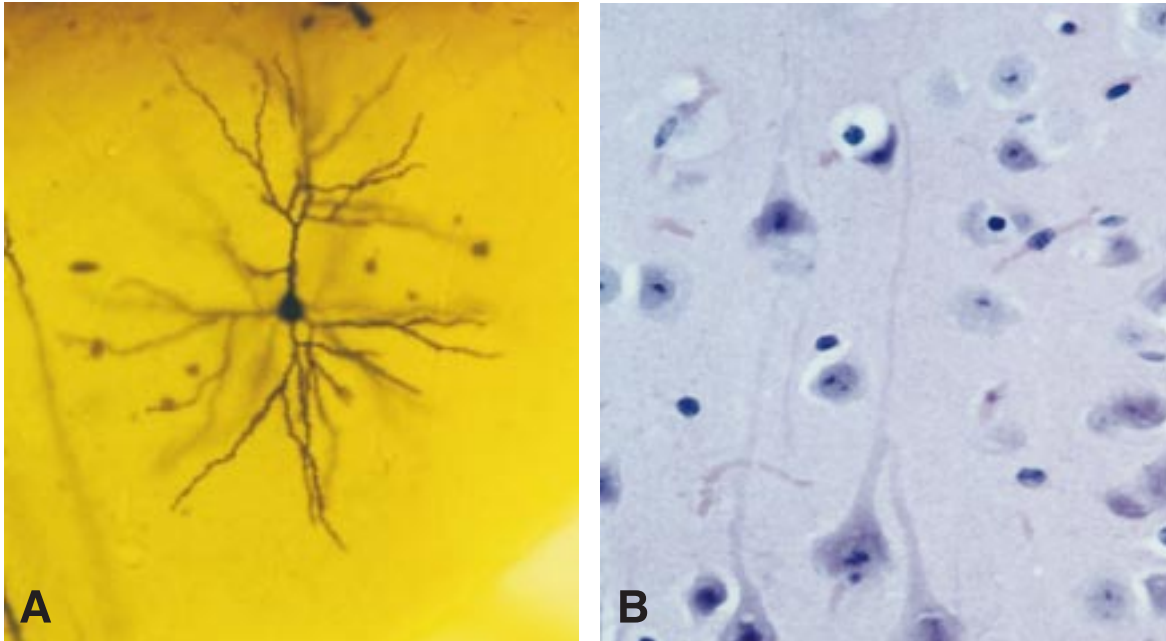


Figura 2. Imágenes de neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratón obtenidas mediante dos técnicas histológicas diferentes. A. Neurona piramidal de la capa II que exhibe el soma y su arborización dendrítica en diferentes planos de profundidad. Técnica de Golgi-Colonnier. 20X. B. Perfil de una neurona piramidal de la capa V. A partir del soma (abajo en el centro), se desprende hacia arriba la dendrita apical. Tinción de hematoxilina y eosina (HE). 40X.

intentar reproducirla (1,19,20). Kölliker se encontró con Cajal en un evento científico llevado a cabo en Berlín en 1889 y Cajal, conocedor de la fama de su interlocutor, aprovechó para mostrarle sus preparaciones histológicas elaboradas con el método de Golgi. Kölliker se interesó en su trabajo y aprendió de él los secretos de la técnica, los puso en práctica y confirmó los hallazgos del científico español. Esto llevó a Kölliker a abandonar su adhesión a la teoría reticular acogida por Golgi y otros científicos de la época y a aceptar los postulados de la teoría neuronal, propuesta por Waldeyer en 1891 (quién además acuñó la palabra “neurona”), y de la cual Cajal se convirtió en principal defensor (2,9,19,20). Según la teoría reticular, las neuronas estarían fusionadas unas con otras a través de sus axones, formando lo que Golgi llamó una “red nerviosa difusa” (3,21), es decir que los circuitos neuronales serían sincitios en términos de la biología actual. La teoría neuronal (más conocida como la doctrina neuronal) estableció que las neuronas son unidades independientes (19,20,22). Esta doctrina

representa el principio organizacional y funcional del sistema nervioso en donde la neurona es la unidad anatómica, fisiológica, genética y metabólica (9,19,20).

Después de Kölliker, casi todos los grandes neurocientíficos europeos aceptaron los descubrimientos de Cajal y adhirieron a la nueva interpretación de la estructura del sistema nervioso (2,9,19,20). Por esa razón, causó sorpresa en el auditorio del Instituto Karolinska el discurso pronunciado por Golgi al recibir el Premio Nobel (9,20), con el que defendió la teoría reticular y atacó la doctrina neuronal, a la que consideraba una propuesta teórica ingeniosa sin suficiente demostración experimental (21). En opinión de Jones (20), la conferencia de Golgi hacía más referencia al pasado, trataba de defender una posición insostenible acudiendo a trabajos antiguos y se presentó con una actitud negativa. Por el contrario, la conferencia de Cajal tenía el estilo de un seminario moderno en el que el ponente resume brevemente sus trabajos

anteriores y, acto seguido, presenta sus hallazgos e interpretaciones más recientes de acuerdo con los últimos avances técnicos (20). En 1906 era tal la aceptación de la doctrina neuronal que algunos de los científicos postulantes del premio nobel de Medicina habían propuesto como candidato sólo a Cajal, por considerar que su aporte había sido más importante y por la interpretación equivocada de Golgi sobre la estructura del sistema nervioso (6).

Pese a lo anterior, e incluso después de recibir el premio Nóbel, Cajal tuvo que continuar defendiendo la doctrina neuronal frente a nuevos ataques por parte de los 'reticularistas'. Para ello, él y varios de sus connotados discípulos desarrollaron nuevas técnicas y conceptos sobre la estructura del sistema nervioso. Los detalles y las conclusiones sobre la experiencia acumulada con sus trabajos en defensa de la doctrina neuronal fueron publicados por Cajal en una monografía en 1933, pocos meses antes de su muerte (23). Dos décadas después, la microscopía electrónica aportó la prueba final inobjetable sobre la discontinuidad de las células del sistema nervioso (24). Aun así, algunos investigadores consideran que las ideas de Golgi sobre la teoría reticular merecen, por lo menos, ser reexaminadas (8,25).

Descubrimiento del aparato de Golgi

Si la microscopía electrónica le dio la razón a Cajal y reafirmó los postulados de la doctrina neuronal, también contribuyó a hacer justicia con uno de los grandes descubrimientos de Golgi, el del organelo intracelular hoy conocido como 'aparato de Golgi' (24,26), y que él denominó 'aparato reticular interno' cuando dio a conocer su hallazgo en 1898. En dos artículos originalmente escritos en italiano y traducidos al inglés hace apenas algunos años (14,27), Golgi describió detalles sobre su descubrimiento, producto de la aplicación de su técnica de impregnación neuronal. No obstante, en esa época muchos dudaban de si el 'aparato reticular interno' era una estructura genuina o un artefacto producido por los depósitos de impregnación metálica en el citoplasma neuronal. Aunque muy pronto se observó el aparato de Golgi en otras células animales y vegetales, su verdadera naturaleza fue

objeto de controversia durante medio siglo, hasta que se comprobó su existencia con el microscopio electrónico (24,26). No es común hallar referencias que hagan honor con toda claridad a la técnica de Golgi como origen del descubrimiento de este importante organelo intracelular, excepto aquellas de autores italianos (3,4,26). Golgi utilizó su 'método rápido' (fijación con bicromato de potasio al 3% y tetróxido de osmio al 1% antes del tratamiento con nitrato de plata al 0,75%), pero ensayó diferentes tiempos para detener la reacción antes de que las neuronas alcanzaran la impregnación total. También ensayó la alcalinización de la solución de osmio-bicromato con fosfato de sodio al 10%. Las dos variantes le permitían observar el organelo citoplasmático antes de realizarse la impregnación completa (*reazione nera*) (14). Golgi llevó a cabo estas observaciones en células de Purkinje del cerebelo de un búho (14) y en neuronas de ganglios espinales de varias especies de mamíferos domésticos (27). En el dibujo de un ganglio de un perro adulto, Golgi describió los diferentes grados de impregnación de las neuronas, en los que se observan células sin completar la 'reacción negra' que exhiben el 'aparato reticular interno' y células totalmente impregnadas (negras) (27).

La técnica de Golgi en la era post-Cajal

Con la muerte de Cajal, y especialmente debido a la guerra civil española, casi desaparece su famosa escuela neurohistológica. La mayoría de sus integrantes fueron perseguidos, desprovistos de sus cargos, encarcelados o emigraron a países de América (28). Uno de los últimos discípulos de Cajal, Rafael Lorente de Nó (1902 - 1990), se radicó en Estados Unidos y continuó por algunos años con los estudios neurohistológicos utilizando la técnica de Golgi. El primer diagrama de los microcircuitos de la neocorteza fue una contribución famosa de Lorente de Nó basada exclusivamente en la técnica de Golgi (29,30). Muchos de los postulados de Lorente de Nó sobre la sinaptología neocortical se confirmaron después mediante la microscopía electrónica (30). Jones (18) le da poca trascendencia a los trabajos realizados con la técnica de Golgi entre 1940 y 1970. No obstante, reconoce dos contribuciones importantes durante ese periodo. Una de ellas es

el método de Sholl para la cuantificación de la arborización dendrítica, que se mantiene vigente desde 1956 (18), y otra es la modificación a la técnica llevada a cabo por Colonnier en 1964 (31), quien introdujo el uso del glutaraldehído mediante perfusión para la fijación inicial y la adición de glutaraldehído a la solución de induración (bicromato de potasio). Ésta se considera una modificación del método de Golgi-Kopsch (10). En 1896, Kopsch fue el primero en utilizar una mezcla de bicromato de potasio con formaldehído. Esta combinación se recomienda hoy para la impregnación de muestras almacenadas en formalina por largo tiempo, tal como ocurre con los especímenes de colección de cerebros humanos (13,32). Las técnicas de Golgi-Kopsch y Golgi-Colonnier han sido preferidas por muchos investigadores debido a que facilitan el trabajo con material preservado en aldehídos y mejora la calidad de la morfología celular, especialmente para su estudio con microscopía electrónica (10,13,18).

También es justo reconocer los aportes de otros investigadores en la década de los años 60; gran parte de estos fueron consignados en las memorias de una reunión internacional realizada en Puerto Rico en 1969 (11,15,33,34). Allí, Scheibel y Scheibel (15) consideraban que la caída abrupta del número de publicaciones y practicantes de la técnica de Golgi durante tanto tiempo fue una "consecuencia directa del poder de la técnica misma". Según estos autores, durante el primer cuarto del siglo XX, la técnica de Golgi generó la acumulación de una gran cantidad de información sobre la estructura del sistema nervioso y los circuitos neuronales, pero no se contaba con los medios adecuados para explorar todas sus implicaciones funcionales. "El método de Golgi impulsó el desarrollo de un mapa detallado del sistema de vías antes de inventarse el automóvil para utilizarlas" (15). Para la década de los años 70 ya se contaba con mejores recursos en el campo de la neurociencia. La microscopía electrónica, así como los avances en neurofisiología, neuropatología y en los estudios del comportamiento, habían dado lugar a nuevos enfoques teóricos. La técnica de Golgi recuperó su importancia. En algunos casos fue necesario

'redescubrir' hallazgos como los de Cajal. Pero esta vez, además de contar con mejores condiciones de trabajo, los estudios se hacían de manera más sistemática que en el pasado y se pasó de la etapa descriptiva a la experimental (15,18). Este resurgimiento de la técnica de Golgi se puede comprobar al consultar el compendio *Cerebral Cortex vol 1*, editado en 1984 por Peters y Jones (18), un clásico de lectura obligada para neurohistólogos. En él se encuentran capítulos extensos escritos por especialistas en cada uno de los principales tipos neuronales de la corteza cerebral; gran parte de la información allí registrada se obtuvo con estudios realizados mediante la técnica de Golgi.

La técnica de Golgi y los avances en microscopía

El perfeccionamiento de las técnicas histológicas ha estado asociado con los avances en la microscopía. Desde su aparición, la técnica de Golgi ha jugado un papel importante debido a la necesidad de desarrollar microscopios que mostraran con fidelidad la calidad de las imágenes tridimensionales de las neuronas impregnadas y sus ramificaciones más finas (1,35). Las características del tejido nervioso y la necesidad de aprovechar mejor esta técnica neurohistológica también contribuyeron al surgimiento de la microscopía confocal (36,37). El primer microscopio confocal fue patentado por Marvin Minsky (el padre de la llamada inteligencia artificial) en 1957. Pero fue sólo hasta 1988 que publicó una memoria de su invento en una revista científica (36), recién aparecidos los primeros microscopios confocales comerciales desarrollados por otros autores. Minsky comenta que la invención de su microscopio confocal fue motivada, principalmente, por su interés en mejorar la observación de las preparaciones de tejido nervioso realizadas con la técnica de Golgi, para tratar de comprender la estructura cerebral como parte de sus estudios sobre redes neuronales artificiales (36). Si bien se han llevado a cabo algunos trabajos en los que se ha aplicado la microscopía confocal al estudio de las neuronas impregnadas por la técnica de Golgi para su reconstrucción tridimensional (37-41), esta tecnología ha sido poco explotada aún para este propósito.

Distinto ha sido lo ocurrido con la microscopía electrónica, la cual contribuyó a revivir el interés por la técnica de Golgi. Su alto poder de resolución demostró la validez de la teoría neuronal y confirmó la existencia real de estructuras tales como las espinas dendríticas y los contactos sinápticos, previamente descritos con la impregnación argéntica (42). Al poder visualizar la forma, el tamaño y la estructura interna de los elementos pre y postsinápticos, se hizo posible identificar las dos neuronas participantes en una sinapsis en particular. Pero la microscopía electrónica por sí misma no permite reconocer, en forma inequívoca, que una dendrita o axón pertenecen a un determinado tipo de neurona. Por lo tanto, fue necesario combinarla con un método que describiera la morfología neuronal completa: la técnica de Golgi (4,10,42). Lograr estandarizar un buen procedimiento para combinar el método de Golgi con la microscopía electrónica no fue tarea fácil. Los depósitos gruesos de cromato argéntico que se depositan dentro de las neuronas interfieren con la observación ultraestructural. Durante las décadas del 60 y del 70 se trabajó para obtener un método que permitiera una adecuada correlación entre la morfología neuronal y su estructura fina. Era necesario hallar un protocolo para desimpregnar (extraer los depósitos de cromato de plata) las células sin perder su marcación y que preservara intacta la ultraestructura de todos los componentes neuronales y sus conexiones sinápticas.

Stell (43,44) y Blackstad (45) fueron los primeros en combinar el método de Golgi con la microscopía electrónica. Posteriormente, Blackstad realizó algunos avances importantes (34,46), pero la innovación más notable la alcanzó, en 1977, un grupo encabezado por el investigador español Alfonso Fairén en la Universidad de Boston, en el laboratorio de Alan Peters, un científico experto en el estudio ultraestructural del sistema nervioso (24). Fairén y colaboradores estandarizaron un método combinado de Golgi y microscopía electrónica (Golgi-ME) basado en el virado al oro (*gold-toned*) de las preparaciones antes de la desimpregnación (10,47,48). Con este método, y algunas modificaciones posteriores realizadas por el mismo autor (10,49-51), se logró

eliminar los depósitos de cromato de plata y reemplazarlos por un precipitado de partículas de oro, muy finas, que proporciona una excelente preservación de los detalles ultraestructurales y de la marcación intracelular. De esta manera, incluso las prolongaciones celulares impregnadas más finas se pudieron reconocer secuencialmente en microscopía óptica y electrónica. En resumen, el método de Golgi-ME permitió demostrar la conexión directa entre dos neuronas, previamente identificadas con microscopía óptica, y sirvió de guía para la identificación de tipos neuronales a nivel ultraestructural. Esto produjo un gran impacto en el estudio de los circuitos sinápticos (10,42,48). El profesor Fairén publicó recientemente un relato detallado sobre los sucesos relacionados con los orígenes y desarrollo posterior de los métodos de Golgi-ME (48). La combinación Golgi-ME también abrió el camino a la aplicación de técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas para correlacionar la morfología y la ultraestructura neuronales con propiedades bioquímicas de las células nerviosas. Para ello fue necesario adaptar la técnica de Golgi a cortes de tejido (42,52-55), pues el procedimiento normal de impregnación se hace sobre bloques o rodajas de cerebro de varios milímetros de espesor, que después se cortan y se montan para su observación (10,13). El método de Golgi en cortes, seguido de virado al oro, se puede combinar, además, con otros métodos, tales como el trazado retrógrado de vías y técnicas electrofisiológicas (10,42,52,54,56,57).

Vigencia de la técnica de Golgi

Después de 133 años del descubrimiento de la técnica de Golgi, y a pesar del avance tecnológico de la neurociencia, este método continúa siendo el procedimiento de mayor utilidad práctica para revelar la morfología neuronal completa (4,58-60). Por otra parte, el método de Golgi, por ser sencillo y de bajo costo, está al alcance de laboratorios modestos (como aquellos en los que Golgi y Cajal lo practicaron) (1,3). Fairén lo resume así: "la técnica de Golgi es sencilla en su ejecución y generosa en la información que proporciona" (10). Los métodos más modernos de marcación neuronal, que emplean la inyección intracelular de diferentes tipos de colorantes, revelan con mayor detalle la complejidad morfológica neuronal,

especialmente de los axones, pero por ser más sofisticados y dispendiosos sólo pueden utilizarse con un reducido número de neuronas (24,59). Además, precisan de laboratorios mejor equipados y profesionales bien entrenados para ejecutarlos. Peters *et al.* (24) hacen la siguiente reflexión sobre el método de marcación intracelular: “Los resultados son espectaculares...sin embargo, el método es técnicamente complicado y requiere de la cooperación entre fisiólogos y anatomistas, un matrimonio difícil de consolidar”.

El Profesor Maxwell Cowan, investigador de gran trayectoria en el uso de técnicas de trazado de vías neuronales, escribió el prólogo del texto atlas sobre el cerebro de ratón basado en la técnica de Golgi (59), cuyo autor es Facundo Valverde, del Instituto Cajal (quizás el más importante neurobiólogo experto en la técnica de Golgi de las últimas cuatro décadas). Cowan destaca allí la vigencia e importancia del método de Golgi: “Lo que conocemos hoy sobre la morfología neuronal se debe, en gran parte, al material estudiado por este método...los métodos de marcación intracelular, en las mejores manos, revelan una mayor complejidad de las arborizaciones axonal y dendrítica. Sin embargo, aunque con ellos se pueden obtener mejores imágenes de la estructura de neuronas individuales, no ofrecen las imágenes panorámicas espléndidas que una buena preparación de Golgi puede proveer”. Por lo tanto, el método de Golgi es más adecuado cuando el objetivo es estudiar la arquitectura neuronal completa de cualquier región del cerebro (59). López-García es aun más enfático en su defensa: “el método de Golgi está vigente en la investigación neuromorfológica...es inservible para algunos tipos de estudios e insustituible para la mayoría” (58). Pero la prueba más importante de su vigencia la constituye el número de publicaciones científicas realizadas durante los últimos años. En una rápida revisión de los resúmenes registrados en PubMed, correspondiente sólo a los últimos cinco años (2001-2006), se encontraron más de un centenar de referencias sobre trabajos de investigación que han utilizado el método de Golgi. Gran parte de ellos se ha llevado a cabo con la técnica de Golgi-Cox modificada por Gibb y Kolb (61). Estos

investigadores lograron estandarizar un protocolo que ofrece tres ventajas: impregna cerebros completos de pequeños animales, produce resultados menos azarosos y garantiza imágenes excelentes de las dendritas y sus espinas. Es importante destacar que muchos de los recientes trabajos realizados con el método de Golgi corresponden a estudios sobre neuropatología humana o experimental (62-67). Finalmente, una prueba más de la vigencia de este método de impregnación neuronal es el hecho de que todavía, y por extraño que parezca, se publican modificaciones a la técnica de Golgi (68-71).

Agradecimientos

El autor recibió entrenamiento sobre la técnica de Golgi-ME en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández (Alicante, España).

Conflicto de intereses

Ninguno.

Financiación

Instituto Nacional de Salud y Colciencias, proyecto 2104-04-11805, y una beca de doctorado.

Referencias

1. **DeFelipe J, Jones EG.** Santiago Ramón y Cajal and methods in neurohistology. *Trends Neurosci* 1992;15:237-46.
2. **López-Piñero JM.** Cajal y la estructura histológica del sistema nervioso. *Investigación y Ciencia* 1993;197:6-13.
3. **Mazzarello P.** Camillo Golgi's scientific biography. *J Hist Neurosci* 1999;8:121-31.
4. **Pannese E.** The Golgi stain: invention, diffusion and impact on neurosciences. *J Hist Neurosci* 1999;8:132-40.
5. **Mörner KA.** The Nobel Prize in physiology or medicine 1906. Presentation speech. En: Nobel Foundation, editor. *Nobel lectures in physiology or medicine 1901-1921*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1967.
6. **Grant G.** How Golgi shared the 1906 Nobel Prize in physiology or medicine with Cajal. [Consultado: junio 11 de 2006]. Disponible en: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/grant/index.html
7. **Corral-Corral I, Corral-Corral C, Corral-Castañedo A.** Cajal's views on the Nobel Prize for physiology and medicine (October 1904). *J Hist Neurosci* 1998; 7:43-9.

8. **Shepard GM.** The legacy of Camillo Golgi for modern concepts of brain organization. *J Hist Neurosci* 1999;8:209-14.
9. **DeFelipe J.** Sesquicentenary of the birthday of Santiago Ramón y Cajal, the father of modern neuroscience. *Trends Neurosci* 2002;25:481-4.
10. **Fairén A, Smith-Fernández A, DeDiego I.** Organización sináptica de neuronas morfológicamente identificadas: el método de Golgi en microscopía electrónica. En: Armengol JA, Miñano FJ, editores. *Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso*. Vol 1. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla; 1996. p.17-56.
11. **Ramón-Moliner E.** The Golgi-Cox technique. En: Nauta WJ, Ebesson SO, editores. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p.32-55.
12. **Grant G.** Gustaf Retzius and Camillo Golgi. *J Hist Neurosci* 1999;8:151-63.
13. **Millhouse OE.** The Golgi methods. En: Heimer L, Robards MJ, editores. *Neuroanatomical tract-tracing methods 1*. New York: Plenum Press; 1981. p.311-44.
14. **Golgi C.** On the structure of nerve cells. 1898. *J Microsc* 1989;155:3-7.
15. **Scheibel ME, Scheibel AB.** The rapid Golgi method. Indian summer or renaissance? En: Nauta WJ, Ebesson SO, editores. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p.1-11.
16. **Fernández N, Breathnach CS.** Luis Simarro Lacabra (1851-1921): from Golgi to Cajal through Simarro, via Ranvier? *J Hist Neurosci* 2001;10:19-26.
17. **García-Albea E.** Luis Simarro: precursor de la neurología española y Gran Maestre de la masonería. *Rev Neurol* 2001;32:990-3.
18. **Jones EG.** History of cortical cytology. En: Peters A, Jones EG, editores. *Cerebral cortex*. Vol.1. Cellular components of the cerebral cortex. New York: Plenum Press; 1984. p.1-32.
19. **Jones EG.** The neuron doctrine 1891. *J Hist Neurosci* 1994;3:3-20.
20. **Jones EG.** Golgi, Cajal and the neuron doctrine. *J Hist Neurosci* 1999;8:170-8.
21. **Golgi C.** The neuron doctrine - theory and facts. Nobel Lecture December 11, 1906. [Consultado: junio 11 de 2006]. Disponible en: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/golgi-lecture.pdf
22. **Ramón y Cajal S.** The structure and connections of neurons. Nobel Lecture December 12, 1906. [Consultado: junio 11 de 2006]. Disponible en: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.pdf
23. **Ramón y Cajal S.** ¿Neuronismo o reticularismo? Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las células nerviosas. *Arch Neurobiol (Madrid)* 1933;13:1-144.
24. **Peters A, Palay SL, Webster H.** The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. New York: Oxford University Press; 1991.
25. **Bennett MV.** Neoreticularism and neuronal polarization. *Prog Brain Res* 2002;136:189-201.
26. **Bentivoglio M.** 1898: the Golgi apparatus emerges from nerve cells. *Trends Neurosci* 1998;21:195-200.
27. **Golgi C.** On the structure of the nerve cells of the spinal ganglia. *J Microsc* 1989;155:9-14.
28. **Martínez-Tello FJ.** La escuela de Cajal. La creación del primer servicio de anatomía patológica en España por D. Francisco Tello. *Revista Española de Patología* 2002;35:1-6.
29. **Lorente de Nó R.** The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. En: Fulton JF, editor. *Physiology of the nervous system*. London: Oxford University Press; 1938. p.291-325.
30. **Nieuwenhuys R.** The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol* 1994;190:307-37.
31. **Colonnier M.** The tangential organization of the visual cortex. *J Anat* 1964;98:327-44.
32. **Vaisamruat V, Hess A.** Golgi impregnation after formalin fixation. *Stain Technol* 1953;28:303-4.
33. **Valverde F.** The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. En: Nauta WJ, Ebesson SO, editores. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p.12-31.
34. **Blackstad TW.** Electron microscopy of Golgi preparations for the study of neuronal relations. En: Nauta WJ, Ebesson SO, editores. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p.186-216.
35. **Merico G.** Microscopy in Camillo Golgi's times. *J Hist Neurosci* 1999;8:113-20.
36. **Minsky M.** Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988;10:128-38.
37. **Boyde A.** Three-dimensional images of Ramón y Cajal's original preparations, as viewed by confocal microscopy. *Trends Neurosci* 1992;15:246-8.
38. **Malach R.** Dendritic sampling across processing streams in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 1992;315:303-12.
39. **Castano P, Marcucci A, Miani A Jr, Morini M, Veraldi S, Rumio C.** Central and peripheral nervous structures as seen at the confocal scanning laser microscope. *J Microsc* 1994;175:229-37.

40. **Castano P, Gioia M, Barajon I, Rumio C, Miani A.** A comparison between rapid Golgi and Golgi-Cox impregnation methods for 3-D reconstruction of neurons at the confocal scanning laser microscope. *Ital J Anat Embryol* 1995;100(Suppl. 1):613-22.
41. **Freire M, Boyde A.** Stereoscopic and biplanar microphotography of Golgi-impregnated neurons: a correlative study using conventional and real-time, direct-image confocal microscopies. *J Neurosci Methods* 1995;58:109-16.
42. **Frotscher M.** Application of the Golgi/electron microscopy technique for cell identification in immunocytochemical, retrograde labeling, and developmental studies of hippocampal neurons. *Microsc Res Techn* 1992;23:306-23.
43. **Stell WK.** Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastructure in Golgi preparations. *Anat Rec* 1965;153:389-97.
44. **Stell WK.** The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *Amer J Anat* 1967;121:401-24.
45. **Blackstad TW.** Mapping of experimental axon degeneration by electron microscopy of Golgi preparations. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1965;67:819-34.
46. **Blackstad TW.** Electron microscopy of experimental axon degeneration in photochemically modified Golgi preparations: a procedure for precise mapping of nervous connections. *Brain Res* 1975;95:191-210.
47. **Fairén A, Peters A, Saldanha J.** A new procedure for examining Golgi impregnated neurons by light and electron microscopy. *J Neurocytol* 1977;6:311-37.
48. **Fairén A.** Pioneering a golden age of cerebral microcircuits: the births of the combined Golgi-electron microscope methods. *Neuroscience* 2005;36:607-14.
49. **Fairén A, DeFelipe J, Martínez-Ruiz R.** The Golgi-EM procedure: a tool to study neocortical interneurons. En: Acosta E, Federoff S, editores. *Glial and neuronal cell biology*. New York: Alan R Liss, Inc.; 1981. p. 291-301.
50. **DeFelipe J, Fairén A.** Synaptic connections of an interneuron with axonal arcades in the cat visual cortex. *J Neurocytol* 1988;17:313-23.
51. **DeFelipe J, Fairén A.** A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 1993;41:769-72.
52. **Freund TF, Somogyi P.** The section-Golgi impregnation procedure.1. Description of the method and its combination with histochemistry after intercellular iontophoresis or retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 1983;9:463-74.
53. **Gabbott PL, Somogyi J.** The 'single' section Golgi-impregnation procedure: methodological description. *J Neurosci Methods* 1984;11:221-30.
54. **Izzo PN, Graybiel AM, Bolam JP.** Characterization of substance P and (Met)enkephalin-immunoreactive neurons in the caudate nucleus of cat and ferret by single section Golgi procedure. *Neuroscience* 1987;20:577-87.
55. **Angulo A, Fernández E, Merchán JA, Molina M.** A reliable method for Golgi staining of retina and brain slices. *J Neurosci Methods* 1996;66:55-9.
56. **Freund TF, Somogyi P.** Synaptic relationships of Golgi-impregnated neurons as identified by electrophysiological or immunocytochemical techniques. En: Heimer L, Záborszky L, editores. *Neuroanatomical tract-tracing methods 2. Recent progress*. New York: Plenum Press; 1989. p.201-38.
57. **Freund TF.** Golgi impregnation combined with pre- and post-embedding immunocytochemistry. En: Cuello AC, editor. *Immunohistochemistry II*. Chichester: John Wiley & Sons; 1993. p.349-67.
58. **López-García C, Nácher J.** Las células del tejido nervioso: neuronas y células gliales. En: Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia F, editores. *Manual de Neurociencia*. Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p.59-93.
59. **Valverde F.** Golgi atlas of the postnatal mouse brain. Viena: Springer-Verlag; 1998.
60. **Valverde F.** Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo. *Rev Neurol* 2002;34:758-80.
61. **Gibb R, Kolb B.** A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 1998;79:1-4.
62. **Black JE, Kodish IM, Grossman AW, Klintsova AY, Orlovskaya D, Vostrikov V, et al.** Pathology of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004;161:742-4.
63. **Sa MJ, Madeira MD, Ruela C, Volk B, Mota-Miranda A, Paula-Barbosa MM.** Dendritic changes in the hippocampal formation of AIDS patients: a quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol* 2004;107:97-110.
64. **Baloyannis SJ.** Morphological and morphometric alterations of Cajal-Retzius cells in early cases of Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study. *Int J Neurosci* 2005;115:965-80.
65. **Marin-Padilla M, Tsai RJ, King MA, Roper SN.** Altered corticogenesis and neuronal morphology in irradiation-induced cortical dysplasia: a Golgi-Cox study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1129-43.
66. **Cook SC, Wellman CL.** Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 2004;60:236-48.
67. **Martínez-Téllez R, Gómez-Villalobos M de J, Flores G.** Alteration in dendritic morphology of cortical neurons

- in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res* 2005;1048:108-15.
68. **Rosoklija G, Mancevski B, Ilievski B, Perera T, Lisanby SH, Coplan JD, et al.** Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys. *J Neurosci Methods* 2003;131:1-7.
69. **Zhang H, Weng SJ, Hutsler JJ.** Does microwaving enhance the Golgi methods? A quantitative analysis of disparate staining patterns in the cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 2003;124:145-55.
70. **Moss TL, Whetsell WO.** Techniques for thick-section Golgi impregnation of formalin-fixed brain tissue. *Methods Mol Biol* 2004;277:277-85.
71. **Friedland DR, Los JG, Ryugo DK.** A modified Golgi staining protocol for use in the human brain stem and cerebellum. *J Neurosci Methods* 2006;150:90-5.

